MycAssay™ Pneumocystis
Roche LightCycler® 2.0
Muestras Respiratorias
REF 080-035

Uso previsto

MycAssay™ Pneumocystis está indicado para su uso por profesionales de laboratorio cualificados para la detección cualitativa del DNA genómico de *Pneumocystis jirovecii* en muestras respiratorias de las vías respiratorias inferiores (p. ej., muestras bronquiales) como ayuda para el diagnóstico de pacientes adultos que se sospecha que padecen una neumonía por *P. jirovecii*.

MycAssay™ Pneumocystis ha sido validada para usarse con el Roche LightCycler® 2.0.

Resumen y explicación

La neumonía por *Pneumocystis jirovecii* (previamente *carinii*) (PCP) es una neumonía oportunista frecuente en pacientes inmunodeprimidos, especialmente en aquéllos con infección por el VIH avanzada y SIDA[1]. Generalmente se adquiere en la comunidad, se presenta en forma subaguda y lleva a una insuficiencia respiratoria progresiva y a la muerte[2] si no se trata. Como profilaxis se administra trimetoprima-sulfametoxazol (Bactrim o Septrin) de forma sistemática a muchos pacientes de riesgo, una práctica que ha reducido sustancialmente la incidencia de PCP, pero aún así se producen casos de neumonía, y personas que no saben que son VIH-positivas pueden ser diagnosticadas de SIDA tras presentar una PCP[3]. La PCP también se desarrolla en otros tipos de pacientes inmunodeprimidos, como los receptores de trasplantes de un órgano sólido, los sujetos con hipogammaglobulinemia y los sujetos con leucemia crónica.

Actualmente, el diagnóstico de PCP se basa en métodos de microscopia, dado que *P. jirovecii* no se puede cultivar en laboratorios de microbiología estándar. El lavado broncoalveolar (BAL, *bronchoalveolar lavage*) es el método preferido para la obtención de muestras. Los métodos de diagnóstico habituales son la inmunofluorescencia o la fluorescencia directa (FD) y la tinción histológica de las muestras[4].

MycAssay™ Pneumocystis es un kit de diagnóstico molecular para la detección de *P. jirovecii* basado en la tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *polymerase chain reaction*) con baliza molecular[5]. El procedimiento completo de la prueba, incluida la extracción de DNA de la muestra clínica, puede realizarse en 4 horas, o en sólo 2 horas si ya se dispone del DNA extraído. Este ensayo ofrece el beneficio directo de una mayor eficacia en el laboratorio combinada con una prueba rápida que conlleva probables beneficios clínicos. La exactitud diagnóstica de la prueba depende en gran medida de la calidad de la muestra.

Principios del ensayo

Después de mezclar los reactivos del kit MycAssay™ Pneumocystis con una muestra que contenga la secuencia diana de DNA de *Pneumocystis* (una sección de la subunidad mayor de los ribosomas mitocondriales de *Pneumocystis*), se producirá la amplificación del DNA mediante un proceso de termociclado. El ensayo también contiene una secuencia de control de amplificación interno (IAC, *internal amplification control*), que es un fragmento de DNA que no está presente en el genoma de *Pneumocystis* ni en otros genomas fúngicos, ni tampoco en genomas bacterianos ni humanos, y cuya finalidad es detectar sustancias inhibidoras de la PCR y confirmar la funcionalidad de los reactivos del ensayo.

Las dianas de DNA amplificadas son detectadas con balizas moleculares (sondas de hibridación compuestas de un oligonucleótido monocatenario que forma una estructura de horquilla). La porción curva de la horquilla contiene una secuencia sonda que es complementaria de una secuencia diana, y la porción recta de la horquilla está formada por hibridación de secuencias de brazo complementarias que se encuentran a cada lado de la secuencia sonda. Un extremo del brazo está unido de forma covalente a un fluoróforo, que emite fluorescencia cuando es excitado por una luz de la longitud de onda apropiada, mientras que el otro extremo del brazo está unido de forma covalente a un extintor de fluorescencia, que suprime la fluorescencia del fluoróforo cuando se encuentra en estrecha proximidad física. Las balizas moleculares no emiten fluorescencia cuando están libres en solución. Sin embargo, cuando se hibridan con una cadena de ácido nucleico que contiene una secuencia diana, experimentan un cambio conformacional que les permite emitir

[1] Morris A, Lundgren JD, Masur H, Walzer PD, Hanson DL, Frederick T, Huang L, Beard CB, Kaplan JE. (2004). Current epidemiology of *Pneumocystis* pneumonia. Emerg Infect Dis: 10: 1713-20.
[2] Miller RF, Allen E, Copas A, Singer M, Edwards SG. Improved survival for HIV infected patients with severe *Pneumocystis jirovecii.* pneumonia is independent of highly active antiretroviral therapy. Thorax 2006;61:716-21.
[3] Kovacs JA, Gill VJ, Meshnick S, Masur H. (2001). New insights into transmission, diagnosis, and drug treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonia. JAMA: 286: 2450-60.
[4] Huang L, Morris A, Limper AH, Beck JM; ATS *Pneumocystis* Workshop Participants. An Official ATS Workshop Summary: Recent advances and future directions in pneumocystis pneumonia (PCP). Proc Am Thorac Soc 2006;3:655-64.
[5] Tyagi S, Kramer FR. (1996). Molecular beacons: Probes that fluoresce upon hybridization. Nature Biotechnology: 14: 303-308.

fluorescencia. La cantidad de fluorescencia en cualquier ciclo dado, o después del ciclo, depende de la cantidad de amplicones específicos que están presentes en ese momento. El sistema Roche LightCycler® 2.0 mide simultáneamente la fluorescencia emitida por cada baliza.

Precauciones

- El kit sirve para el diagnóstico *in vitro*.
- El kit está diseñado para ser usado exclusivamente por profesionales de laboratorio. Es preciso poner en práctica procedimientos para la manipulación de muestras que no generen aerosoles. Deben seguirse las precauciones habituales y las directrices del centro para la manipulación de todas las muestras. Myconostica Ltd. tiene a su disposición una Hoja de datos sobre la seguridad de los materiales.
- Esta prueba se debe utilizar exclusivamente con el Roche LightCycler® 2.0.
- No use los reactivos ni los controles si las bolsas protectoras llegan abiertas o rotas.
- Los reactivos y los controles no son intercambiables entre kits con números de lote diferentes.
- Nunca mezcle reactivos ni controles de tubos diferentes, aunque sean del mismo lote.
- Nunca use los reactivos ni los controles después de su fecha de caducidad.
- No se deben volver a congelar ni volver a usar los reactivos ni los controles después de abiertos.
- Use ropa protectora y guantes desechables cuando manipule los reactivos del kit.
- Evite la contaminación microbiana y con desoxirribonucleasa (DNAasa) de los reactivos cuando tome muestras parciales de los tubos.
- Se recomienda usar puntas de pipeta de desplazamiento positivo o con filtro desechables de baja retención, libres de DNAasa y estériles.
- Use una nueva punta para cada muestra o reactivo.
- Deseche los reactivos no usados y el material de desecho de acuerdo con las normativas nacionales, federales, estatales y locales.
- Para evitar la contaminación con amplicones de *Pneumocystis* o IAC, no abra los tubos de la reacción después de la amplificación.
- No coma, beba ni fume en áreas donde se manipulen las muestras o los reactivos del kit.
- Las concentraciones bajas de DNA pueden ser inestables si no se conservan correctamente. Se recomienda almacenar las extracciones de DNA a una temperatura de -80 ^{o}C para preservar su integridad. Siempre que sea posible debe evitarse también realizar varias secuencias de descongelación y congelación.

Contenido del kit

Descripción

El kit consta de cinco bolsas selladas de aluminio con 3 compartimentos cada una que se pueden usar por separado. Cada bolsa contiene reactivos suficientes para 8 reacciones.

		Volumen
Tubo 1 (tapón naranja)	dNTPs $MgCl_2$ Solución amortiguadora del complejo de la DNA polimerasa	66 µL
Tubo 2 (tapón azul)	< 0,01% de cebadores < 0,01% de balizas moleculares < 0,0001% de control de amplificación interno (IAC) El IAC es un plásmido de DNA recombinante que contiene una secuencia no infecciosa no relacionada con ninguna de las secuencias diana (*Pneumocystis*) Amortiguador Tris-HCl	66 µL
Tubo 3 (tapón transparente)	Control negativo Agua	25 µL
Tubo 4 (tapón negro)	Control positivo < 0,0001% de DNA de control positivo La molécula de control positivo es un plásmido recombinante que contiene las secuencias diana de *Pneumocystis*. Amortiguador Tris-HCl	25 µL

El kit también contiene:

- CD-ROM *MycAssay™ Pneumocystis Myconostica Protocol* (Protocolo del ensayo *MycAssay™* Pneumocystis de Myconostica)
- Instrucciones de uso
- Certificado de análisis

Conservación

El kit se debe guardar congelado (entre -15 °C y -25 °C) hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la caja del kit, momento en el cual se debe desechar de acuerdo con la normativa local.

Una vez abierta una bolsa, su contenido se debe usar inmediatamente; no se puede volver a congelar ni tampoco usar otra vez.

Equipo/materiales requeridos y no incluidos

- Sistema de PCR en tiempo real Roche LightCycler® 2.0 (incluyendo el manual de usuario, ordenador asociado y software LightCycler® v4.1)
- Centrifugadora de carrusel LC 2.0 (opcionalmente adaptadores para tubos capilares para minicentrifugadora)
- Carrusel de muestras para tubos capilares *de* 20 µL
- Tubos capilares LC 2.0 de 20 µL con tapones
- Gradilla de soporte para tubos capilares
- Liberador de tubos capilares
- Herramienta de taponamiento
- Microcentrifugadora
- Agitadora vorticial (vórtex)
- Micropipetas (volúmenes requeridos: 7,5-20 µL)
- Puntas con filtro de baja retención estériles
- Guantes desechables sin polvo
- Solución comercial descontaminante de DNA
- Kit de aislamiento de DNA (véase más adelante)
- Kit MycAssay™ CC (véase más adelante)

Muestra

La muestra para el ensayo MycAssay™ Pneumocystis es DNA total extraído de muestras clínicas de BAL. Se recomienda con este fin (y se utilizó durante la validación) el siguiente equipo y kit de aislamiento de DNA, suministrado por Myconostica Ltd.:

- Kit de extracción de DNA fúngico MycXtra® (REF: 080-005, disponible en Myconostica).
- Vortex-Genie 2 (Scientific Industries Inc., Nueva York, EE. UU.).
- Plato adaptador para agitadora vorticial (REF: 080-015, disponible en Myconostica).

Kit MycAssay™ Colour Compensation (CC)

El análisis preciso de los datos producidos con el ensayo MycAssay™ Pneumocystis requiere la aplicación de un archivo de compensación del color generado mediante el kit Myconostica MycAssay™ CC [ref 080-080]. Cuando se haya creado, el archivo se puede aplicar a múltiples series analíticas en el mismo aparato. Para más detalles póngase en contacto con su distribuidor local.

Notas del procedimiento

- Lea el protocolo completo antes de empezar.
- El proceso completo del ensayo MycAssay™ Pneumocystis (excluida la extracción de DNA) dura aproximadamente 2 horas, según el número de muestras analizadas.
- La preparación de la prueba debe realizarse en una zona de trabajo específica para PCR o en un laboratorio de procedimientos previos a la PCR. Si no se dispone de una zona de trabajo específica para PCR, la prueba se debe realizar en una zona del laboratorio dedicada[6], que se limpie regularmente con agentes descontaminantes de DNA.
- No obstante, evite el uso de reactivos descontaminantes de DNA durante la preparación del sistema de PCR en tiempo real, ya que pueden inhibir el ensayo.
- Utilice micropipetas para transferir líquidos. Deben utilizarse micropipetas de uso exclusivo para la preparación de estas reacciones; estas micropipetas deben descontaminarse con regularidad.
- Se recomienda utilizar puntas con filtro de baja retención para asegurarse de que no se pierda DNA durante el procedimiento de preparación.
- **Deben tomarse precauciones al manipular el Tubo 4. Este tubo contiene el material de DNA plantilla, y su contaminación podría generar resultados positivos falsos de la prueba.**

[6] Por ejemplo, véase Mifflin, T. E. (2003). Setting up a PCR Laboratory. *In* PCR Primer, 2nd Ed. (eds. Dieffenbach and Dveksler). Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY. USA.

- Use guantes en todo momento.
- Todos los tubos capilares se deben cerrar después del uso y antes de desecharlos.
- Anote con exactitud las posiciones de los tubos capilares que contienen muestras relevantes en el carrusel de 32 posiciones en el plan del experimento.
- El análisis preciso de los datos requiere la aplicación de un archivo de compensación del color generado mediante el kit Myconostica MycAssay™ CC.

Procedimiento de uso:

1. Preparación del sistema de PCR en tiempo real

1.1 Para comenzar, encienda el sistema de PCR en tiempo real LightCycler® 2.0 (el instrumento, el ordenador asociado y la centrifugadora) e inicie el software correspondiente. Introduzca el nombre de usuario y la contraseña requeridos y seleccione la base de datos diagnóstica. Si se trata de la primera serie analítica del día, realice primero una autocomprobación del instrumento antes de preparar una serie analítica.

1.2 **Recuerde:** se debe realizar una serie analítica de compensación de color antes de analizar los resultados de MycAssay™ Pneumocystis en el LightCycler® 2.0. No obstante, no es necesario realizar la serie analítica antes de utilizar este producto y podrá realizarla y aplicarla retrospectivamente a los archivos de las series analíticas.

1.3 Asegúrese de que se haya limpiado el área de trabajo con reactivos descontaminantes de DNA y de que se haya dejado secar completamente; evite usar estos productos durante la preparación del ensayo, ya que un exceso de solución limpiadora puede inhibir las reacciones de PCR.

1.4 Una bolsa contiene un tubo de cada tipo: Tubo 1, Tubo 2, Tubo 3 y Tubo 4. Hay suficientes reactivos en una bolsa para realizar 8 reacciones. Deben realizarse al menos una reacción de control positivo y una reacción de control negativo en cada serie analítica en la que los reactivos sean del mismo lote del kit. Por lo tanto, con una bolsa se pueden analizar 6 muestras de paciente. Si es necesario analizar más de 6 muestras de paciente, se puede usar más de una bolsa si las bolsas usadas proceden del mismo lote del kit. No obstante, en una serie analítica el LightCycler® 2.0 sólo puede contener un máximo de 32 muestras. Por consiguiente, se pueden procesar un máximo de 30 muestras de paciente en una serie analítica (4 bolsas).

1.5 Calcule el número de reacciones necesarias; para ello, consulte la tabla siguiente:

Número de bolsas	Número máximo de muestras de paciente
1	6
2	14
3	22
4	30

1.6 Saque el número apropiado de bolsas del congelador. No use ninguna bolsa que ya no esté sellada. Si se congelaron las muestras de análisis después de la extracción, sáquelas también del congelador.

1.7 Rasgue el número de bolsas necesarias para abrirlas y saque los tubos. Si se va a usar más de una bolsa, pero solamente se va a procesar un conjunto de controles positivo y negativo, sólo es necesario extraer los Tubos 3 y 4 de una bolsa. **Deben tomarse precauciones al manipular el Tubo 4. Este tubo contiene material de DNA de control positivo y la contaminación podría dar lugar a resultados positivos falsos en la prueba.**

1.8 Deje que se descongele el contenido de los tubos colocándolos en el banco de laboratorio durante 5-10 minutos, asegurándose de que se haya descongelado totalmente el contenido de todos los tubos antes de continuar. Mezcle en la agitadora vorticial el contenido de los tubos y las muestras de paciente y, a continuación, centrifúguelos en una microcentrifugadora mediante un ciclo corto para asegurarse de que todo el contenido se acumule en el fondo de los tubos antes de usarlos.

1.9 Coloque el número requerido de tubos capilares de 20 µL en una gradilla de soporte para tubos capilares. Tenga cuidado de no dejar ninguna marca en el vidrio.

1.10 Siempre debe prepararse primero el control negativo, seguido de las muestras de análisis. El control positivo debe prepararse siempre en último lugar.

1.11 En la siguiente tabla se muestran los volúmenes de reactivo y de DNA:

Reactivo	Reacción		
	Control negativo	**Muestra de paciente**	**Control positivo**
Tubo 1 (tapón naranja)	7,5 µL	7,5 µL	7,5 µL
Tubo 2 (tapón azul)	7,5 µL	7,5 µL	7,5 µL
Tubo 3 (tapón transparente)	10 µL	-	-
Muestra de paciente	-	10 µL	-
Tubo 4 (tapón negro)	-	-	10 µL
Volumen total	25 µL	25 µL	25 µL

1.12 Añada los reactivos en el orden mostrado en la tabla anterior: Tubo 1 y luego el Tubo 2, seguidos de la plantilla (control negativo, muestra de paciente o control positivo). Tenga cuidado al tomar muestras parciales del Tubo 1, ya que el líquido es ligeramente viscoso y puede adherirse al borde interno del tubo. Si sucediese esto, vuelva a centrifugar para acumular el contenido final en la base del tubo antes de intentar extraer las muestras parciales finales.

1.13 Use una nueva punta de pipeta para cada transferencia de líquido. Vuelva a cerrar los tubos de reactivos después de usarlos y deséchelos inmediatamente, así como el contenido restante, en un recipiente de cierre hermético para residuos clínicos. Los reactivos no usados no pueden guardarse para un uso posterior.

1.14 Tome precauciones especiales al pipetear el Tubo 4 (DNA de control positivo) para asegurarse de que no contamine ninguna otra reacción. Cierre los tapones de los otros tubos capilares antes de abrir el Tubo 4 para reducir el riesgo de contaminación cruzada.

1.15 Utilice la herramienta de taponamiento para cerrar cuidadosamente los tubos capilares con los tapones suministrados en la caja de tubos capilares. Asegúrese de que los tubos capilares estén firmemente cerrados. Si se desea, los tubos capilares se pueden cerrar cuando se haya añadido la plantilla a la reacción para reducir la posibilidad de una contaminación cruzada/ambiental.

1.16 Si no dispone de una centrifugadora de carrusel, centrifugue las muestras con los adaptadores suministrados en una gradilla de soporte mediante una minicentrifugadora. En caso contrario, continúe con el paso 1.17.

1.17 Transfiera con sumo cuidado todos los tubos capilares al carrusel en exactamente el mismo orden que se encuentran en la gradilla de soporte, comenzando por el primer tubo capilar en la posición 1, y continúe en orden ascendente sin dejar huecos. Presione cada tubo capilar hacia abajo hasta que esté firmemente insertado.

1.18 Si todavía no ha centrifugado las muestras en la Sección 1.16, centrifúguelas mediante la centrifugadora de carrusel LC 2.0.

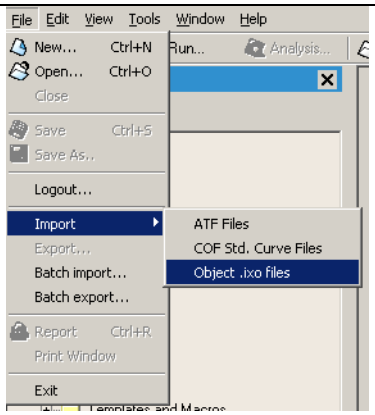
1.19 Continúe en la Sección 2 inmediatamente. Las reacciones del ensayo MycAssay™ Pneumocystis son estables en el banco durante un máximo de 60 minutos.

1.20 Después de la preparación de la PCR, asegúrese de que se limpie meticulosamente el área de trabajo usando reactivos descontaminantes de DNA.

2. Procesamiento de la serie analítica

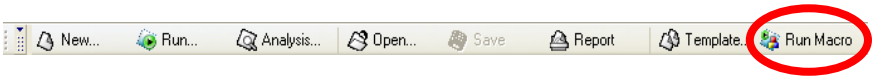
2.1 Inserte el CD-ROM **MycAssay Pneumocystis Myconostica Protocol**.

2.2 Vaya a **Import** a través del directorio **File** y seleccione **Object .ixo files**. Importe el archivo **Macro MAP v1.2.ixo** del CD en su base de datos.



2.3 Vaya a **Save** a través del directorio **File** y guarde el macro en la ubicación deseada de su base de datos.

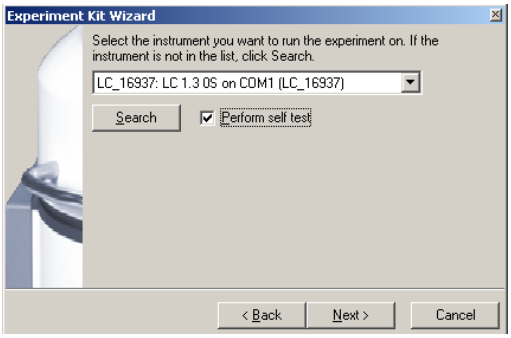
2.4 Seleccione la opción **Run Macro** de la barra de herramientas.



2.5 Seleccione el archivo de plantilla **Macro MAP v1.2** y pulse **Open**.

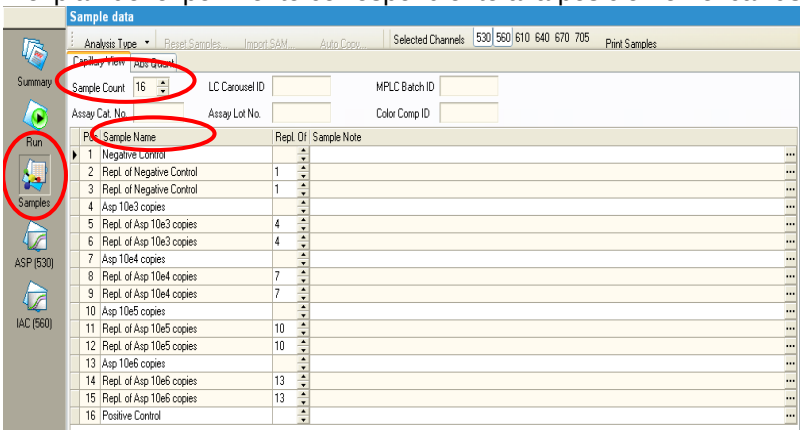
2.6 Siga las instrucciones del asistente. Seleccione la casilla **Perform Self-Test** si se trata de la primera serie analítica del día.

Experiment Kit Wizard
Welcome to the Experiment Kit Wizard.
The Experiment Kit Wizard helps you run a new experiment using the provided kit. The first step is to create the new experiment.
To start the wizard and create a new experiment, click Next.
If you don't want to create a new experiment at this time, click Cancel.
< Back
Next >
Cancel


Experiment Kit Wizard
Select the instrument you want to run the experiment on. If the instrument is not in the list, click Search.
LC_16937: LC 1.3 OS on COM1 (LC_16937)
Search
Perform self test
< Back
Next >
Cancel

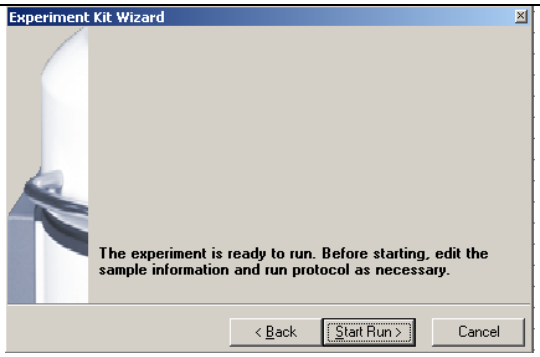
2.7 Asigne un nombre al archivo de la serie analítica y guárdelo en la ubicación deseada.

2.8 Vaya a la sección de muestras haciendo clic en la ficha situada a la izquierda de la pantalla. Edite el número de la muestra en la casilla **Samples Count** y los nombres en la ficha **Capillary view**. Asigne a las muestras el nombre indicado en el plan del experimento correspondiente a la posición en el carrusel.


Sample data
Summary
Run
Samples
ASP (530)
IAC (560)
Sample Count 16
LC Carousel ID
MPLC Batch ID
Assay Cat. No.
Assay Lot No.
Color Comp ID
Pos. Sample Name Repl. Of Sample Note
1 Negative Control
2 Repl. of Negative Control 1
3 Repl. of Negative Control 1
4 Asp 10e3 copies
5 Repl. of Asp 10e3 copies 4
6 Repl. of Asp 10e3 copies 4
7 Asp 10e4 copies
8 Repl. of Asp 10e4 copies 7
9 Repl. of Asp 10e4 copies 7
10 Asp 10e5 copies
11 Repl. of Asp 10e5 copies 10
12 Repl. of Asp 10e5 copies 10
13 Asp 10e6 copies
14 Repl. of Asp 10e6 copies 13
15 Repl. of Asp 10e6 copies 13
16 Positive Control

2.9 Introduzca el carrusel de centrifugado en el instrumento LC 2.0. Asegúrese de que la ranura debajo de la posición 1 de la muestra en el carrusel encaje en la clavija de la cámara térmica. Asegúrese de que el carrusel está firmemente insertado en la cámara y cierre la tapa.

2.10 Cuando haya terminado, pulse el botón **Start**. Asegúrese de que el instrumento haya detectado todos los tubos capilares en el carrusel y que se haya iniciado el programa.

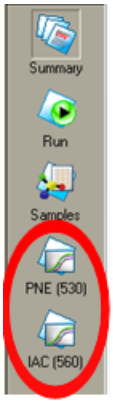

Experiment Kit Wizard
The experiment is ready to run. Before starting, edit the sample information and run protocol as necessary.
< Back
Start Run >
Cancel

3. Análisis e interpretación de los datos

3.1 **Recuerde:** se debe aplicar un objeto de compensación de color antes de analizar los resultados de MycAssay™ Pneumocystis en el LightCycler® 2.0. Si todavía no ha creado un objeto de compensación, hágalo ahora antes de continuar con el análisis y la interpretación de los datos.

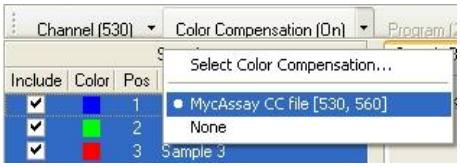
3.2 Cuando haya finalizado la serie analítica, compruebe el contenido del informe visualizado e imprímalo si lo desea.

3.3 Los resultados de Pneumocystis se pueden visualizar en la sección de análisis PNE (530) y los resultados IAC en la sección de análisis IAC (560).

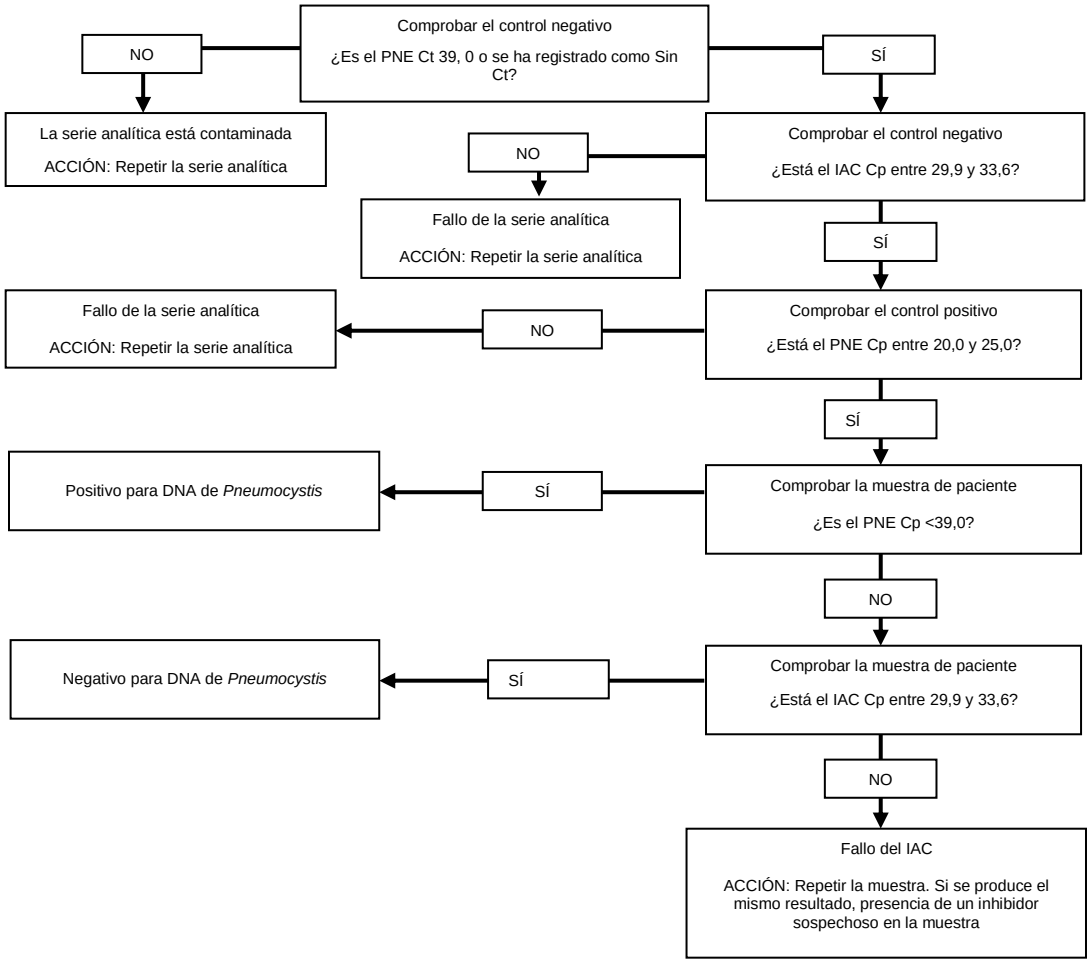


3.4 En las dos secciones, **PNE (530)** e **IAC (560)**, seleccione el archivo correcto de compensación del color (**MycAssay CC file**) que se debe aplicar al experimento.

3.5



3.6 Analice cada muestra, comenzando con los controles, como se muestra en la gráfica de flujo a continuación (también encontrará detalles en la tabla que aparece bajo la gráfica de flujo).


Comprobar el control negativo
¿Es el PNE Ct 39, 0 o se ha registrado como Sin Ct?
NO
SÍ
La serie analítica está contaminada
ACCIÓN: Repetir la serie analítica
Comprobar el control negativo
¿Está el IAC Cp entre 29,9 y 33,6?
NO
Fallo de la serie analítica
ACCIÓN: Repetir la serie analítica
SÍ
Fallo de la serie analítica
ACCIÓN: Repetir la serie analítica
NO
Comprobar el control positivo
¿Está el PNE Cp entre 20,0 y 25,0?
SÍ
Positivo para DNA de *Pneumocystis*
SÍ
Comprobar la muestra de paciente
¿Es el PNE Cp <39,0?
NO
Negativo para DNA de *Pneumocystis*
SÍ
Comprobar la muestra de paciente
¿Está el IAC Cp entre 29,9 y 33,6?
NO
Fallo del IAC
ACCIÓN: Repetir la muestra. Si se produce el mismo resultado, presencia de un inhibidor sospechoso en la muestra

Muestra	**PNE (530) Cp**	**IAC (560) Cp**	**Interpretación**	**Acción que debe realizarse**
Control negativo	≥39,0 o Sin Cp	Entre 29,9-33,6	Control negativo aceptable	Los resultados del paciente son válidos
Control negativo	≥39,0 o Sin Cp	<29,9 o >33,6	Fallo en el control negativo	Repetir toda la serie analítica
Control negativo	<39,0	Entre 29,9-33,6	Contaminación	Repetir toda la serie analítica
Control positivo	Entre 20,0-25,0	ND	Control positivo aceptable	Los resultados del paciente son válidos
Control positivo	<20,0 o >25,0	ND	Fallo en el control positivo	Repetir toda la serie analítica
Muestra de paciente	≥39,0 o Sin Cp	Entre 29,9-33,6	Negativo para *Pneumocystis*	Comunicar resultado: Resultado n.º 1
Muestra de paciente	<39,0	ND	Positivo para *Pneumocystis*	Comunicar resultado: Resultado n.º 2
Muestra de paciente	≥39,0 o Sin Cp	<29,9 o >33,6	Fallo del IAC en la muestra	Repetir la muestra: Resultado n.º 3

Consulte *Generación de informes clínicos* (Resultados n.º 1, n.º 2 o n.º 3).

4. Resolución de problemas

4.1 El control negativo ha generado una señal positiva en el canal 530:

- Se produjo contaminación durante la preparación. No pueden considerarse precisos los resultados de toda la serie analítica.

→ Repita toda la serie analítica, teniendo gran cuidado al añadir las plantillas, en particular el control positivo (Tubo 4), para asegurarse de que no se produzca una contaminación cruzada.

→ Asegúrese de que el área de trabajo y los instrumentos sean debidamente descontaminados antes y después de su uso.

- Se ha colocado incorrectamente el control negativo en el instrumento.

→ Anote correctamente los tubos capilares en el software.

4.2 El valor de Cp del IAC del control negativo se encuentra fuera del intervalo aceptable:

- Se ha inhibido la PCR.

→ Asegúrese de que el área de trabajo y los instrumentos estén completamente secos después de usar agentes descontaminantes antes de proceder a la preparación para la PCR.

- Las condiciones de conservación del kit no cumplían las instrucciones presentadas en el apartado *Conservación* de estas instrucciones de uso o el kit ha caducado.

→ Compruebe que se hayan seguido las condiciones de conservación correctas del kit. Compruebe la fecha de caducidad de los reactivos (en la etiqueta de la bolsa/caja del kit) y repita el proceso con un kit que no haya caducado en caso necesario.

- No se ha añadido el reactivo de los Tubos 1 ó 2 a la reacción de PCR o se ha añadido una cantidad dos veces mayor del Tubo 2.

→ Repita la serie analítica teniendo cuidado en la fase de preparación. Estos errores pueden detectarse si se observan niveles más altos o más bajos de líquido en un tubo capilar de reacción en comparación con los otros.

- No se ha aplicado el archivo CC correcto a los datos.

→ Cree un archivo CC mediante el kit Myconostica MycAssay CC, aplíquelo a los resultados y vuelva a realizar el análisis. Para información detallada sobre el kit consulte a su distribuidor local.

4.3 El control positivo es negativo:

- Las condiciones de conservación del kit no cumplían las instrucciones presentadas en el apartado *Conservación* de estas instrucciones de uso o el kit ha caducado.

→ Compruebe que se hayan seguido las condiciones de conservación correctas del kit. Compruebe la fecha de caducidad de los reactivos (en la etiqueta de la bolsa/caja del kit) y repita el proceso con un kit que no haya caducado en caso necesario.

- Se produjo un error durante la preparación y la plantilla de control positivo (Tubo 4) se colocó en el tubo de reacción erróneo.

→ Repita la serie analítica, teniendo extremo cuidado durante la fase de preparación. Estos errores pueden detectarse si se observa un nivel más alto de líquido en un tubo de reacción y un nivel más bajo en otro en comparación con el nivel normal.

- No se ha añadido el reactivo de los Tubos 1 ó 2 a la reacción.

→ Repita la serie analítica teniendo cuidado en la fase de preparación. Estos errores pueden detectarse si se observan niveles más bajos de líquido en este tubo capilar de reacción que en los otros.

- Se ha colocado incorrectamente el control positivo en el instrumento.

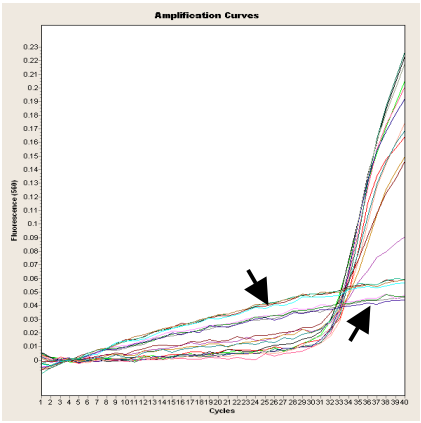
→ Anote correctamente los tubos capilares en el software.

4.4 La(s) muestra(s) de paciente son negativas y el IAC está fuera de rango (Resultado n° 3):

- Es probable que la(s) muestra(s) de paciente contengan inhibidores de la PCR.

→ Recomendamos extraer DNA de las muestras usando el kit de extracción de DNA fúngico MycXtra™.

4.5 La muestra de paciente es negativa en la sección PNE (530) y la gráfica IAC (560) se aleja de forma significativa de la línea base normal (como se muestra en la imagen de ejemplo inferior; las flechas indican gráficas anómalas):



- Se ha inhibido la reacción de PCR.

→ Asegúrese de que el área de trabajo y los instrumentos estén completamente secos después de usar agentes descontaminantes antes de proceder a la preparación para la PCR.

→ Analice de nuevo la muestra de paciente. Si el problema reaparece, el inhibidor de la PCR está presente en la muestra. Identifique la muestra como “Indeterminada”.

4.6 Los resultados en la sección IAC (560) coinciden casi exactamente con los resultados en la sección PNE (530).

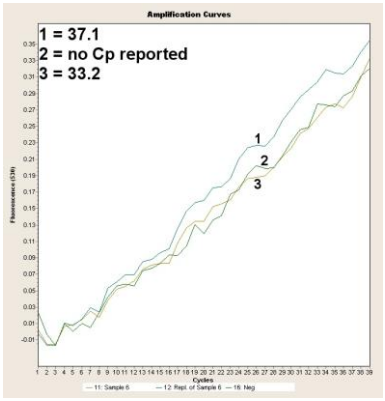
- No se ha aplicado ningún archivo de compensación de color o se ha aplicado uno incorrecto a los resultados del experimento.

→ Compruebe en las dos secciones de análisis si la compensación de color está activada y si se ha aplicado el mismo archivo MycAssay CC en los dos canales.

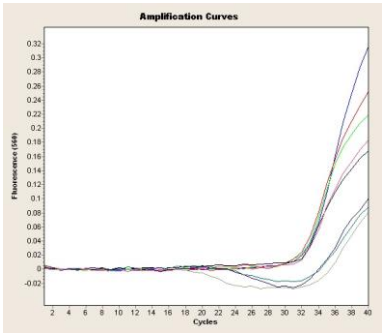
4.7 La línea base para determinadas muestras coincide con el control negativo, indicando que no se ha producido ninguna amplificación. No obstante, el software ha presentado un valor Cp positivo (como muestra la figura inferior):

- La emisión de un valor Cp positivo para una gráfica de amplificación negativa sólo se ha producido dos veces en 154 reacciones negativas realizadas durante los estudios de validación.

→ Si esto ocurre, repita el análisis de la(s) muestra(s) para confirmar el resultado *Negativo*.



4.8 Al aplicar el objeto CC, algunos valores en el canal 560 IAC se reducen y aparecen valores Cp que se encuentran fuera del rango aceptable:



- Esto es totalmente normal para las reacciones que contienen concentraciones elevadas de DNA diana y no interferirá en la interpretación de los resultados del paciente.

→ Siga el procedimiento de análisis normal; verá que para las muestras positivas para Pneumocystis el resultado IAC no es necesario para decidir acerca del resultado para el paciente.

4.9 No se obtienen resultados para ningún canal con ninguna muestra ni control:

- Las condiciones de conservación del kit no cumplían las instrucciones presentadas en el apartado *Conservación* de estas instrucciones de uso o el kit ha caducado.

→ Compruebe que se hayan seguido las condiciones de conservación correctas del kit. Compruebe la fecha de caducidad de los reactivos (en la etiqueta de la bolsa/caja del kit) y repita el proceso con un kit que no haya caducado en caso necesario.

- El equipo usado no tiene un funcionamiento óptimo.

→ Compruebe que el instrumento de PCR en tiempo real tiene el historial de mantenimiento actualizado y que ha sido totalmente calibrado según se describe en su Guía de instalación y mantenimiento.

- Se ha utilizado un protocolo incorrecto durante la preparación del software.

→ Consulte la Sección 2 y elija el archivo del protocolo correcto, según se especifica para cada tipo/versión del software, del CD-ROM Myconostica Protocol. Sólo puede cargarse el archivo apropiado para el software. Repita la serie analítica usando el archivo del protocolo correcto.

Si tiene más preguntas o experimenta cualquier problema, póngase en contacto con el servicio de atención al cliente (productsupport@lab21.com).

Características de rendimiento y limitaciones

Datos de rendimiento analítico del sistema LightCycler® 2.0

El kit se validó inicialmente utilizando el sistema Cepheid SmartCycler®. Ciertas afirmaciones sobre el rendimiento del ensayo se volvieron a validar con la plataforma LightCycler® 2.0 de Roche, utilizando tubos capilares de vidrio de 20 µL (Roche, n.º de catálogo 04929292001 ó 11909339001), y se describen a continuación. En los casos en los que no se esperaba que las diferencias entre las plataformas afectaran al rendimiento del ensayo y, por consiguiente, a la afirmación relativa al rendimiento, el estudio no se repitió. Estos resultados, obtenidos utilizando la plataforma SmartCycler®, se consideran transferibles a la plataforma LightCycler® 2.0.

Sensibilidad analítica

Con el protocolo anteriormente descrito y una molécula de DNA recombinante de *Pneumocystis* generada en Myconostica, se determinó un límite de detección (LoD, *limit of detection*) para *Pneumocystis* de < 30 copias: Este valor se determinó usando un plásmido de DNA recombinante que contenía la secuencia diana. Dado que la secuencia diana de *Pneumocystis* es mitocondrial, existirán numerosas copias por célula, pero se desconoce el número.

Selectividad analítica

La selectividad analítica se analizó usando DNA extraído de diversas especies fúngicas y no fúngicas. Las siguientes especies no presentaron un resultado positivo:
Alternaria alternata, Aspergillus flavus, A. fumigatus, A. niger, A. terreus, Blastomyces capitatus, Candida albicans, C. glabrata, C. parapsilosis, C. tropicalis, género Cladosporium, Cryptococcus neoformans, Doratomyces microsporus, Fusarium solani, Rhizomucor pusillus, Rhodotonila rubra, Saccharomyces cerevisiae, Scedosporium apiospermum, S. prolificans, Sporothrix schenkii, Trichosporon capitatum. Las siguientes especies bacterianas no presentaron un resultado positivo: *Bordetella pertussis, Corynebacterium diphtheriae, Escherichia coli, Haemophilus influenzae, Lactobacillus plantarum, Legionella pneumophila, Moraxella catarrhalis, Mycoplasma pneumoniae, Neisseria meningitidis, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumoniae, S. pyogenes, S. salivarius*.

Se establecieron las siguientes afirmaciones sobre el rendimiento utilizando el sistema Cepheid SmartCycler®.

Sustancias que producen interferencia (contraindicaciones de uso)

Los siguientes compuestos fueron analizados a concentraciones clínicamente relevantes y se comprobó que no inhiben el ensayo: acetilcisteína, anfotericina, dipropionato de beclometasona, budesonida, colistimetato sódico, propionato de fluticasona, fumarato de formoterol dihidrato, bromuro de ipratropio, lidocaína, manitol, sulfato de salbutamol, salmeterol, Septrin (trimetoprima-sulfametoxazol), cloruro sódico, cromoglicato sódico, terbutalina y tobramicina.

El DNA genómico humano no presenta un resultado positivo con este ensayo.

Evaluación del rendimiento

Se estableció el valor de corte a un Ct de 39.0 después del análisis de un conjunto de muestras clínicas procedentes de diferentes poblaciones de pacientes.

Se utilizaron muestras clínicas de lavado broncoalveolar (BAL) obtenidas en dos hospitales, extraídas con el kit MycXtra® y almacenadas, para evaluar el rendimiento del kit MycAssay™ Pneumocystis. Se realizó una comparación de los resultados de la PCR con los de la microscopia de inmunofluorescencia.

Diagnóstico mediante PCR frente a diagnóstico mediante microscopia

	Positivo con microscopia	Negativo con microscopia		
Positivo con PCR	45	8	0,85	PPV
Negativo con PCR	2	33	0,94	NPV
	0,96 Sensibilidad	0,80 Especificidad		

Tabla 1: Especificidad y sensibilidad diagnósticas del kit MycAssay™ Pneumocystis en comparación con la microscopia de inmunofluorescencia.

La tabla 1 representa datos obtenidos de pacientes con diagnóstico de infección por el VIH, pacientes sin infección por el VIH y pacientes con estado de VIH indeterminado. Los pacientes con neumonía por *Pneumocystis* tienen cantidades muy variables de microorganismos detectables; cuanto menor es el valor de Ct, mayor es la probabilidad de enfermedad. Los pacientes con infección por el VIH y neumonía por *Pneumocystis* tienden a tener cifras más altas de microorganismos detectables que los pacientes que no están infectados por este virus, pero existe una superposición considerable. La gráfica de dispersión de la figura 1 demuestra esta superposición. Para dar información más completa, dado que el conjunto de datos de la tabla 1 incluía a pacientes cuyo estado de VIH era desconocido, en la figura 1 se incluye la gráfica de dispersión para este grupo (columna 3):

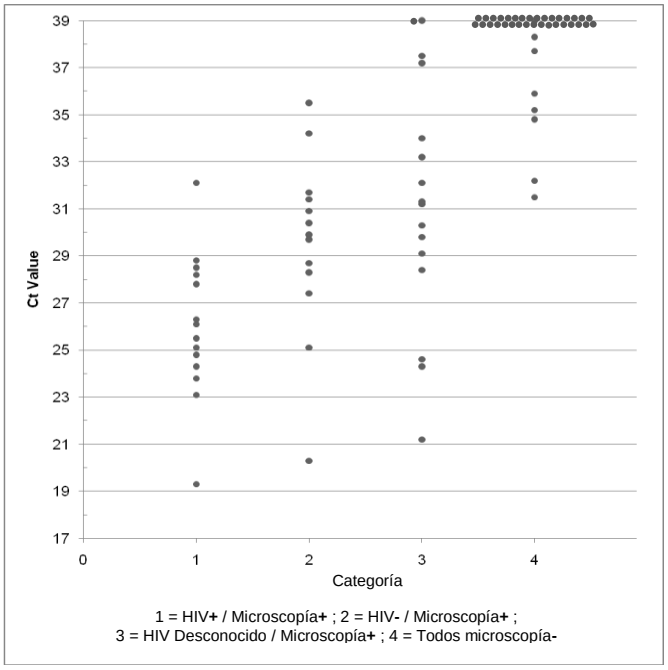


Figura 1: Gráfica de dispersión de los valores de Ct obtenidos del DNA extraído de muestras respiratorias de pacientes. Se describen cuatro grupos.

Generación de informes clínicos

El kit MycAssay™ Pneumocystis se ha diseñado para ser usado como ayuda en el diagnóstico de la neumonía por *Pneumocystis*. Los resultados deben considerarse en el contexto del estado clínico del paciente y de los resultados de otras pruebas diagnósticas.

Los siguientes son informes recomendados, que dependen de la interpretación del resultado del ensayo.

Resultado n.º 1
"*Pneumocystis jirovecii* no detectado."

Resultado n.º 2
"Pneumocystis jirovecii detectado*.* Resultado positivo. Indicar el valor de Ct."

Resultado n.º 3
"La prueba fracasó; inhibidores u otra sustancia desconocida presentes."

Cuanto menor sea el valor de Ct, mayor será la probabilidad de enfermedad. Los valores de Ct próximos al valor de corte de 39.0 tienen mayor probabilidad de representar una colonización que una infección, pero algunos pacientes pueden padecer la enfermedad con presencia de una cantidad muy pequeña de *P. jirovecii*, lo que indica una muestra de mala calidad, tratamiento previo o la naturaleza de la carga fúngica en ese paciente concreto.

Limitaciones del procedimiento

- La principal limitación de este procedimiento es la calidad de la muestra primaria:
  - Si la muestra es muy pequeña o no se obtuvo de la zona afectada del pulmón, la prueba será menos sensible y puede dar un resultado falsamente negativo.
  - Las muestras obtenidas mediante lavado broncoalveolar deben centrifugarse antes de la extracción del DNA del sedimento.
  - Los datos también demostraron que una reducción del volumen de sobrenadante usado en el proceso de extracción, que se obtiene en el paso de centrifugación, reduce la proporción de inhibidores que entran en el sistema.
- Aunque el procedimiento de extracción de DNA fúngico MycXtra™ se ha diseñado para eliminar los inhibidores de la PCR, no se han evaluado todos los fármacos ni todas las poblaciones de pacientes.

- El procedimiento no se ha evaluado de forma exhaustiva con esputos ni se ha evaluado con muestras salinas inducidas ni en muestras procedentes de niños.
- Pueden obtenerse resultados positivos falsos por contaminación externa de la muestra original o de la prueba. Esta contaminación podría provenir de aire contaminado con *P. jirovecii*, de una técnica experimental deficiente con respecto al control positivo o de contaminación externa (especialmente de la pipeta) con DNA de *P. jirovecii*.
- Dado que se puede obtener un resultado positivo verdadero en muestras de pacientes con una colonización transitoria o persistente por *P. jirovecii*, se requiere aplicar el criterio clínico para interpretar el resultado de la prueba.

AUTORIZACIÓN DE COMERCIALIZACIÓN

TopTaq™ Hot Start es suministrado por QIAGEN. QIAGEN® es una marca registrada de Qiagen GmbH, Hilden, Alemania.

SmartCycler® es una marca registrada de Cepheid, 904 Caribbean Drive, Sunnyvale, CA, 94089, Estados Unidos.

Este producto se vende bajo autorización del Public Health Research Institute, Newark, New Jersey, Estados Unidos, y puede usarse bajo los derechos de la patente del PHRI exclusivamente para diagnóstico *in vitro* en seres humanos.

LightCycler® es una marca registrada de Roche Diagnostics, GmbH.

Lab21,184 Cambridge Science Park,
Cambridge CB4 0GA , United Kingdom.
Telephone: +44 (0) 1638 552 882 Facsimile: +44 (0) 1638 552 375
Email: productsupport@lab21.com

IVD

CE